

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-093726

(43)Date of publication of application : 16.04.1993

(51)Int.CI.

G01N 33/543

(21)Application number : 03-  
253625

(71)Applicant : CANON INC

(22)Date of filing :

01.10.1991 (72)Inventor : TAKAYAMA

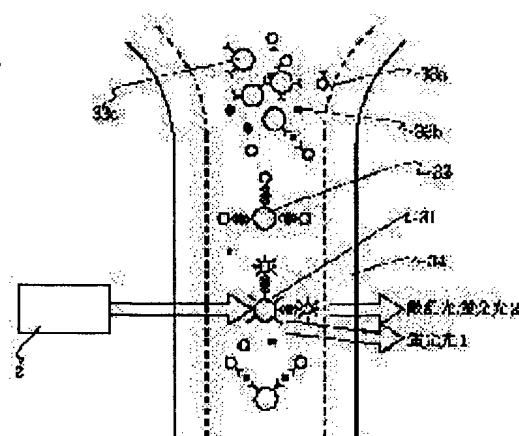
HIDETO  
TANAKA  
KAZUSANE  
ONISHI  
TOSHIICHI  
NISHIMURA  
MATSUOMI  
MIYAZAKI  
TAKESHI

## (54) METHOD AND APPARATUS FOR MEASURING OBJECT TO BE INSPECTED AND REAGENT USED THEREFOR

### (57)Abstract:

PURPOSE: To achieve higher measuring accuracy by labeling a carrier particle by a second label different from the first label which labels an active substance for a specified component to detect the first label with the detection of the second label as trigger.

CONSTITUTION: Compound bodies 31 and 32 of carrier particles, a substance to be detected and a fluorescent substance, a fluorescent labeled substance 3a, a substance 33 to be detected, carrier particles 33C and others such as dust and bubbles are mixed in a sample liquid which flows through a passage part of a flowcell so as to be contained in a sheath liquid 34. When a laser



beam is emitted from a laser light source 2, a fluorescent light 1 is generated from the particles 33c and a scattered light and a fluorescent light 2 are generated from the substance 33a. As the compound bodies 31 and 32 pass by the irradiation position, the scattered light and the fluorescent lights 1 and 2 are all generated. So, when the fluorescent light 1 is detected, the carrier particles 33c is identified to detect the fluorescent light 2 with the particles as trigger. Thus, a label intrinsic to the carrier particles as applied and detected thereby enabling highly accurate measurement.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.11.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2683172

[Date of registration] 08.08.1997

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
G 0 1 N 33/543識別記号 庁内整理番号  
A 7906-2 J  
S 7906-2 J

F I

技術表示箇所

(21)出願番号 特願平3-253625  
(22)出願日 平成3年(1991)10月1日(71)出願人 000001007  
キヤノン株式会社  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号  
(72)発明者 高山秀人  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内  
(72)発明者 田中和實  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内  
(72)発明者 大西敏一  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内  
(74)代理人 弁理士 丸島儀一

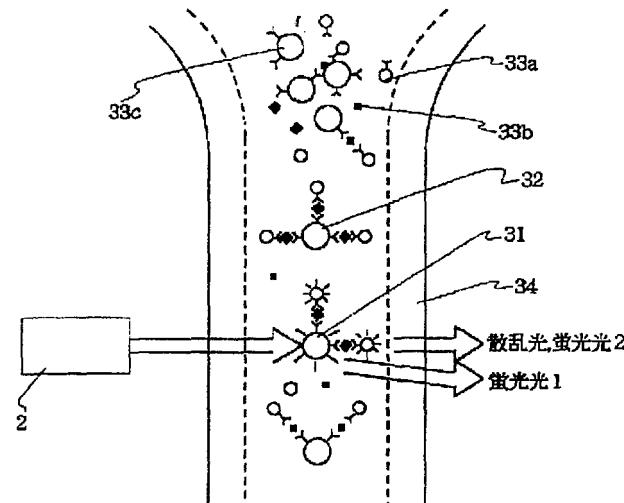
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 検体測定の方法及び装置、並びにこれに用いる試薬

## (57)【要約】

【目的】 抗原抗体反応や核酸のハイブリダイゼーション等を利用して検体中の特定微量成分を検出するに際して、ノイズ成分の影響を排除して精度の高い測定が行なえる手法、並びにこのための試薬の提供。

【構成】 検体中の特定成分に対し活性な物質を担体粒子に結合させた第1の試薬と、前記特定成分に対し活性な物質を第1標識で標識した第2の試薬とを検体と反応させて、得られた複合体中の個々の物質を測定して前記特定成分を測定する方法において、上記担体粒子は前記第1標識とは異なる第2標識で標識され、該第2標識を検出して、該第2標識の検出をトリガとして前記第1標識を検出すること特徴とする検体測定方法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体中の特定成分に対し活性な物質を担体粒子に結合させた第1の試薬と、前記特定成分に対し活性な物質を第1標識で標識した第2の試薬とを検体と反応させて、得られた複合体中の個々の物質を測定して前記特定成分を測定する方法において、

上記担体粒子は前記第1標識とは異なる第2標識で標識され、該第2標識を検出して、該第2標識の検出をトリガとして前記第1標識を検出すること特徴とする検体測定方法。

【請求項 2】 検体中の特定成分に対し活性な物質を担体粒子に結合させた第1の試薬と、前記特定成分に対し活性な物質を第1標識で標識した第2の試薬とを検体と反応させて得られた複合体中の物質が順次通過するフローセルと、該通過する個々の物質を測定する測定手段とを有し、該検出結果に基づいて前記特定成分を検出する装置において、

上記担体粒子は前記第1標識とは異なる第2標識で標識され、該第2標識を検出する手段と、該第2標識の検出をトリガとして前記第1標識を検出する手段を有すること特徴とする検体測定装置。

【請求項 3】 検体中の特定成分に対し活性な物質を担体粒子に結合させた第1の試薬と、前記特定成分に対し活性な物質を第1標識で標識した第2の試薬とを有し、上記担体粒子は前記第1標識とは異なる第2標識で標識されたことを特徴とする検体測定用試薬。

【請求項 4】 前記担体粒子を照射光に対する波長変換物質で標識した請求項1記載の方法又は請求項2記載の装置又は請求項3記載の試薬

【請求項 5】 前記波長変換物質は蛍光物質である請求項4記載の方法又は装置又は試薬。

【請求項 6】 前記波長変換物質は高調波発生物質である請求項4記載の方法又は装置又は試薬。

【請求項 7】 前記担体粒子を磁性物質で標識した請求項1記載の方法又は請求項2記載の装置又は請求項3記載の試薬。

【請求項 8】 前記担体粒子を放射性物質で標識した請求項1記載の方法又は請求項2記載の装置又は請求項3記載の試薬。

【請求項 9】 前記活性作用は抗原抗体反応もしくは核酸ハイブリダイゼーションである請求項1記載の方法又は請求項2記載又は請求項3記載の試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は例えば抗原抗体反応や核酸のハイブリダイゼーションを利用して検体中の特定微量成分を検出する検体測定の技術分野に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年の特定微量成分の検出技術の進歩は、臨床検査の分野で各種疾患の早期診断や発病後の診

断等に大きな役割を演じてきている。1958年S.A.Bergerによって放射線ヨードを用いて標識してインスリンを定量するという方法が発表されて以来、IgE、IgG、CRP、マイクログロブリン等の血漿蛋白、AFP、CEA、CA19-9等の腫瘍マーカー、TS-H、T<sub>1</sub>等のホルモン類、血中薬物、HBV、HIV等のウイルス及びその抗体、DNAやRNA等の核酸が測定可能になり、しかも自動化により多数の検体処理が可能になった。

【0003】これら生体微量成分の多くは抗原抗体反応を利用した免疫学的な方法、もしくは核酸-核酸ハイブリダイゼーションを利用した方法が用いられている。こうした分析方法の例としては、被検出物質と特異的に結合する抗体又は抗原又は一本鎖の核酸をプローブとして、これを微粒子、ビーズ、反応槽の壁等の固相表面に固定し、被検出物質と抗原抗体反応もしくは核酸ハイブリダイゼーションを行わせる。この際に、酵素、蛍光性物質、発光性物質などの検知感度の高い標識物質を抱持した標識化抗体や標識化抗原を用いて、抗原抗体複合物や二本鎖の核酸を検出することで被検出物質を定量するものである。

【0004】図9は被検出物質を抗原とした蛍光免疫測定法（サンドイッチ法）の代表的な例を示す説明図である。担体粒子21に検体中に含まれる抗原22と特異的に結合する第1の物質である抗体24を予め固定化した第1の試薬を用意して、これを例えれば血清等の検体を混合して検体中の抗原22と抗原抗体反応を行なう（第1反応）。次に抗原22と特異的に結合する抗体23に蛍光物質25を標識化した第2の試薬を加えて混合し、複合体を生成する（第2反応）。この第2反応の後に複合体の蛍光測定を行なうことで検体中の抗原22を定量する。

【0005】図10はいわゆるフローサイトメトリの技術を利用して、上記サンドイッチ法の蛍光測定を行なう例を示す。上記のような手順で得られた反応後の複合体31、32を含むサンプル液を反応液槽38中に用意する。なおサンプル液中には反応複合体と共に検体中の様々な物質、担体粒子、標識物質などが混在している。この反応液槽38にポンプ39によって圧力を与えてサンプル液をフローセル35に送り込む。フローセル35内にはシース液34が流れしており、シースフロー原理によって層流が形成され多数の複合体31、32は細い一列の配列になって流れる。この流れに対してレーザ光源36から標識蛍光物質を励起させ得る波長のレーザ光が照射される。複合体31がレーザ光によって照射されると、担体粒子によって散乱光37aが発生し、同時に標識物質33aからの蛍光光37bも発せられる。ところが反応の標識物質33aや被検出物質33bや担体粒子33cが単独で流れてきても散乱光37aと蛍光光37bは同時には発生しない（あるいは非常に微弱である）

ため、あるレベル以上の散乱光と蛍光光が同時に発生した時にのみデータをとり込むようにすれば、反応後の複合体31、32のみをそれ以外のノイズ成分から選択的に分離して測定することができる。

【0006】図11は図10の測定における前方散乱光及び蛍光の測定信号の波形を示す図である。同図は理想的な測定例であるが、フローセルのレーザ光が照射されている部分に複合体が流れてきた場合には担体粒子によって大きな散乱光が発生するので前方散乱光強度51が増加し、それ以外の場合には弱い。そこでこの前方散乱光の強度がある一定値以上になった時トリガ信号52を生成し、そのタイミングで蛍光強度53を測定すれば、複合体からの蛍光強度を選択的に得ることができる。もし蛍光の発生があれば被検出物質が存在して抗原抗体反応あるいは核酸ハイブリダイゼーション反応が起きていると判断され、逆に蛍光の発生がなければ反応が起きていないと判断できる。そして多数の測定の統計的な処理により被検出物質の定量が可能である。

#### 【0007】

【発明が解決しようとしている課題】しかしながら実際には図11のような理想的な出力は得られず、図12に示すように複合体そのものによる前方散乱光強度の増加以外にも、他の原因によって光強度の増加が起こってしまう。この原因としては、もともとの反応液中に含まれる浮遊物や気泡の発生によるものと考えられる。このような場合、図12に示すように前方散乱光強度は複合体によるピーク61のほかに、浮遊物や気泡などによるピーク62が発生してしまうので、トリガ信号も複合体による信号63以外に浮遊物や気泡などによる信号64が作成されてしまい、その時点での蛍光強度(ゼロレベル)を読み取ってしまう。するとあたかも抗原抗体反応もしくは核酸ハイブリダイゼーション反応が起きていらない担体粒子が存在したように誤認してしまうことになり、特に定量の測定精度に著しい悪影響を与えててしまう。

【0008】本発明は上記課題を解決し、精度の高い測定が行なえる検体測定の手法、並びにこのための試薬を提供することを目的とする。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、検体中の特定成分に対し活性な物質を担体粒子に結合させた第1の試薬と、前記特定成分に対し活性な物質を第1標識で標識した第2の試薬とを検体と反応させて、得られた複合体中の個々の物質を測定して前記特定成分を測定する方法において、上記担体粒子は前記第1標識とは異なる第2標識で標識され、該第2標識を検出して、該第2標識の検出をトリガとして前記第1標識を検出すること特徴とするものである。

#### 【0010】

#### 【実施例】

(実施例1) 以下、本発明にかかる実施例を図面を用いて詳細に説明する。第1の実施例では担体粒子の標識物質として照射光に対する波長変換物質、具体的には蛍光物質を使用し、発生する蛍光光により担体粒子を識別するものである。

【0011】本実施例に用いられる試薬について詳しく述べる。第1の試薬は、例えれば粒子径1μm程度のポリスチレン系微粒子に蛍光物質を標識したものに対して、検体中の被検出物質に対して活性な第1の物質を結合させることにより得られる。蛍光標識した担体粒子は、例えればポリスチレンなどのポリマー微粒子に蛍光性物質を物理結合あるいは化学結合させることにより、あるいはポリマー微粒子を重合する時に蛍光性のモノマーを共重合することにより得られる。蛍光物質としてはシアニン系色素、アクリジン系色素、ローダミン系色素などがあり、後述する第2の試薬の蛍光特性とは異なる蛍光性物質を適宜選択して用いられる。又、蛍光性微粒子に被検出物質に対し活性な第1の物質を結合させるのは定法により物理結合又は化学結合によりなされる。

【0012】被検出物質に対し活性な第1の物質としては、例えれば、天然もしくは合成のペプチド、蛋白質、酵素、糖類、レクチン、ウイルス、細菌、核酸、DNA、RNA、抗体などがある。その中でも、臨床的には特に有用な物質として以下のものがあげられる。IgG、IgEなどの免疫グロブリン、補体、CRP、フェリチン、α<sub>1</sub>又はβ<sub>2</sub>マイクログロブリンなどの血漿蛋白及びそれらの抗体、α-フェトプロテイン、癌胎児性抗原(CEA)、CA19-9、CA-125などの主要マーカー及びそれらの抗体、黄体化ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、ヒト纖毛性ゴナドトロビン(hCG)、エヌトロジエン、インシュリンなどのホルモン類及びそれらの抗体、HBV関連抗原HIV、ATLなどのウイルス感染関連物質及びそれらの抗体、ジフテリア菌、ボツリヌス菌、マイコプラズマ、梅毒トレポネーマなどのバクテリア類及びそれらの抗体、トキソプラズマ、トリコモナス、リーシュマニア、トリバノゾーマ、マラリア原虫などの原虫類及びそれらの抗体、フェニトイシン、フェノバルビタールなどの抗てんかん薬、キニジン、ジコキシニンなどの心血管薬、テオフィリンなどの抗喘息薬、クロラムフェニコール、ゲンタマイシンなどの抗生物質などの薬物類及びそれらの抗体、その他酵素、菌体外毒素(ストレプトリジンGなど)及びそれらの抗体などがあり、検体中の被検出物質と抗原抗体反応を起こす物質が被検出物質の種類に応じて適宜選択される。

【0013】又、上記のような抗原抗体反応ではなく、核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合には、第1の物質としては検査対象となる核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を持つ核酸プローブが用いられる。

【0014】一方、第2の試薬は、被検査物質に対して

活性で且つ前記第1の物質とは異なる第2の物質に対して、前記担体粒子を標識した蛍光性物質の蛍光特性とは異なる蛍光特性を有する蛍光物質、発光性物質などの標識物質を結合させたものである。結合には多価アミン、カルボジイミド類などの架橋剤を用いて化学結合される。

【0015】第1の試薬、第2の試薬とともに水を主成分とする分散媒体に分散される。又、分散媒体には適宜pH緩衝剤、蛋白質、界面活性剤、水溶性高分子化合物などが添加される。第1の試薬と第2の試薬と検体の反応は被検出物質と試薬中の被検出物質に対し活性な物質の反応性、被検出物質の濃度などにより条件は異なり、それぞれ適正な条件で反応後、反応液を水を主成分とする希釈液により希釈されてサンプル液が作成される。

【0016】図1は実施例の測定装置の構成図である。いわゆるシースフロー原理によってフローセル1の流通部1a内を高速の層流となったシース液に包まれてサンプル液が紙面垂直方向に通過し、サンプル液中に含まれる種々の微小物は一列になって順次流れる。この流れと直交する方向にレーザ光源2が配置され、出射するレーザ光はレンズ3によって梢円形状の微小スポットに変換されて流通部に向けて照射される。レーザ光の波長は担体粒子を標識する蛍光物質、及び第2の物質を標識する蛍光物質の双方を励起させ得るもののが使用される。照射位置を通過する微小物体から発生する前方散乱光を暗視野原理によって測定するために、フローセル1を挟んでレンズ3と反対の光軸上に波長選択フィルタ10、光ストップ11、集光レンズ4a、4b、光検出器5が順次に配置されている。波長選択フィルタ10は測定目的に応じて波長選択性の異なるフィルタを切り替えることができるようになっている。特定の本実施例では波長選択フィルタ10はレーザ光の波長λを選択的に透過する特性を有したもの用いる。

【0017】一方、サンプル液の流れの方向とレーザ光の照射方向の光軸に直交する方向の光軸上に、フローセル1側から順に集光レンズ6a、6b、コリメートレンズ6c、波長選択性を有するダイクロイックミラー7a、7b及び反射ミラー7cが配置されている。ダイクロイックミラー7a、7bの反射方向にはバリアフィルタ8a、8b、光検出器9a、9bが配置されており、反射ミラー7cの反射方向にはバリアフィルタ8c、光検出器9cが配置されている。

【0018】フローセル1の流通部1aを順次流れるサンプル液中の担体粒子や気泡やゴミなどによって散乱光が発生し、担体粒子に標識される蛍光色素によって第1の波長の蛍光光1が、又、第2の物質の蛍光標識物質によって第2の波長の蛍光光2が発生する。蛍光光1はダイクロイックミラー7a、バリアフィルタ8aの組によって波長選別されて光検出器9aで強度検出される。

又、蛍光光2はダイクロイックミラー7b、バリアフィ

10

20

30

40

50

ルタ8bの組によって波長選別され光検出器9bによって強度検出される。又、光検出器9cは側方散乱光強度を検出するためのものであるが、本実施例では使用しないため省略しても良い。

【0019】図2は蛍光性標識された担体粒子を用いた本実施例の測定の説明図であり、フローセル中の流通部内の様子を示す。シース液34に包まれるようにして流れのサンプル液中には、複合体31、32、蛍光標識された第2の物質33a、被検出物質33b、担体粒子33c、その他ゴミや気泡等が混在しており、これらが流通部内を順次流れる。照射レーザ光によって、担体粒子からは散乱光及び蛍光光1が発生し、蛍光物質からは蛍光光2が発生する。なお蛍光物質や被検出物質は非常に微小であるためこれらからは散乱光は発生しない、あるいは発生するにしても非常に微弱である。担体粒子と被検出物質と蛍光物質との複合体31、32が照射位置を通過すると、散乱光、蛍光光1、蛍光光2の全て発生する。蛍光光1が検出されたら担体粒子であると判断され、本実施例ではこれをトリガにして蛍光光2を検出する。又、蛍光光1と散乱光の出力の論理積をとって担体粒子を認識しても良い。

【0020】図3は図1に示す装置における測定信号の波形図である。従来は蛍光光を検出するためのトリガ信号を生成するのに前方散乱光強度を用いていたが、図3の72のように担体粒子以外のゴミや気泡等によっても前方散乱光強度が大きくなるためここでトリガ信号が発生してしまい精度上問題があった。これに対して本実施例では蛍光光1を基準に、これがある閾値を越えたらトリガ信号74を生成する。あるいは散乱光（前方又は側方）と蛍光光1の論理積によってトリガ信号を生成するにしても良い。そしてこのトリガ信号のタイミングで蛍光光2の強度75を測定する。よって本実施例では従来のようにゴミや気泡等のノイズ成分の影響を受けることなく、複合体中の標識物質量を精度良く測定して検体中の被検出成分の定量を高精度に行なうことができる。

【0021】次に上記実施例の作用効果を明確にするために次の実験を行なった。粒径1.0μm、粒子濃度0.5wt%の蛍光性物質FITCを結合させたエポキシ化ポリスチレン微粒子の水分散液を10000倍に希釈して、上記測定装置で測定を行なった。測定は従来例の方法と本実施例の方法とを比較するため、まず前方散乱光の強度をトリガにしてそのトリガ数を30秒カウントした。次に蛍光光1の強度をトリガにして同様に30秒間トリガ数をカウントした。その結果、前方散乱光をトリガにした従来の方法の方が約20%ほどカウント数が多かった。この結果でカウント数が高いのは、水分散液に含まれるゴミや気泡等のノイズ成分が影響してこれらがカウント値に含まれてしまったものと考えられる。このように担体粒子に蛍光性物質FITCを結合させた

標識微粒子を用いることにより  $S/N$  比の高い高精度検出が可能となった。

【0022】(実施例2) 次に本発明の第2の実施例を説明する。本実施例では担体粒子の標識に照射光に対する波長変換物質、具体的には高調波発生物質(例えはSHGやTHG)を使用し、これによって波長変換された光を検出することにより担体粒子を識別するものである。

【0023】本実施例においては、第1の試薬は、例えは粒子径  $1 \mu m$  程度の SHG(第二高調波発生)活性を持つ微粒子に検体中の被検出物質に対して活性な第1の物質を結合させることにより得られる。SHG活性を持つ微粒子の一例として、二次の超分子分極率  $\beta$  が大きい分極性物質を含有するポリマー微粒子などが挙げられる。より具体的な例として、p-ニトロアニリンをポリオキシエチレンやラクトンポリマーにドープさせて SHG 活性を有する材料を製造することができる。又、スチレンモノマーに p-ニトロアニリンを化学修飾して乳化重合することにより、SHG活性を持つ微粒子に被検出物質に対して活性な第1の物質を結合させるのは、常法により物理結合又は化学結合によりなされる。

【0024】図4は上記SHG物質で標識された担体粒子を用いた本実施例の測定の説明図であり、フローセル中の流通部内の様子を示す。なお測定装置全体の構成は先の図1とほぼ同様であり、図1の波長選択フィルタ10はレーザ光の波長  $\lambda$  の半波長  $\lambda/2$  を選別透過する特性を有し、光検出器5によって SHG 物質で波長変換された光を検出するようになっている。なお、担体粒子の標識として第三高調波を発生する THG 物質を用いる場合には波長選択フィルタ10は  $\lambda/3$  の波長を選択するものを使用する。シース液34に包まれるようにして流れるサンプル液中には、複合体31、32、蛍光標識された第2の物質33a、被検出物質33b、担体粒子33c、その他ゴミや気泡等が混在しており、これらが流通部内を順次流れる。波長  $\lambda$  の照射レーザ光によって、担体粒子からは波長  $\lambda$  の散乱光1及び SHG 物質によって波長変換された波長  $\lambda/2$  の散乱光2が発生し、蛍光物質からは蛍光光が発生する。なお蛍光物質や被検出物質は非常に微小であるためこれらからは散乱光は発生しない、あるいは発生するにしても非常に微弱である。担体粒子と被検出物質と蛍光物質との複合体31、32が照射位置を通過すると、散乱光1、散乱光2、蛍光光の全て発生する。図1における波長選択フィルタ10では散乱光2( $\lambda/2$ )が波長選択され、これが光検出器5で検出されたら担体粒子であると判断され、本実施例ではこれをトリガにして蛍光光を検出する。なお、散乱光1と散乱光2を同時に検出できるような光学系を設けて散乱光1と散乱光2のそれぞれの強度の論理積を演算してこれをトリガとしても良い。

【0025】図5は図1に示す装置における測定信号の

波形図である。従来は蛍光光を検出するためのトリガ信号を生成するのに前方散乱光強度( $\lambda$ )を用いていたが、図5の72のように担体粒子以外のゴミや気泡等によっても前方散乱光強度が大きくなるためここでトリガ信号が発生してしまい精度上問題があった。これに対して本実施例では SHG 物質によって波長変換された波長  $\lambda/2$  の散乱光2を基準に、これがある閾値を越えたらトリガ信号74を生成する。そしてこのトリガ信号のタイミングで蛍光光の強度75を測定する。よって本実施例では従来のようにゴミや気泡等のノイズ成分の影響を受けることなく、複合体中の標識物質量を精度良く測定して検体中の被検出成分の定量を高精度に行なうことができる。

【0026】次に上記実施例の作用効果を明確にするために次の実験を行なった。粒径  $1, 0 \mu m$ 、粒子濃度  $0, 5 \text{ wt\%}$  の p-ニトロアニリンをドープさせた SHG 活性を有するポリスチレン微粒子の水分散液を 1000 倍に希釈して、上記測定装置で測定を行なった。測定は従来例の方法と本実施例の方法とを比較するため、まず波長選択フィルタ10として波長  $\lambda$  を選択するものを用いて、波長  $\lambda$  の前方散乱光1の強度をトリガにしてそのトリガ数を 30 秒カウントした。次に波長選択フィルタ10として波長  $\lambda/2$  を選択するものを用いて、波長  $\lambda/2$  の前方散乱光2の強度をトリガにして同様に 30 秒間トリガ数をカウントした。その結果、前方散乱光1をトリガにした従来の方法の方が約 20%ほどカウント数が多かった。この結果でカウント数が高いのは、水分散液に含まれるゴミや気泡等のノイズ成分が影響してこれらがカウント値に含まれてしまったものと考えられる。このように担体粒子に SHG 活性物質を結合させた標識微粒子を用いることにより  $S/N$  比の高い高精度検出が可能となった。

【0027】(実施例3) 次に本発明の第3の実施例を説明する。本実施例では担体粒子の標識に磁性物質を使用し、磁気を検出することにより担体粒子を識別するものである。

【0028】本実施例においては、第1の試薬は、例えは粒子径  $1 \mu m$  程度の磁化し得る物質を含む微粒子に検体中の被検出物質に対して活性な第1の物質を結合させることにより得られる。磁性体にはマグネタイトやマグネライト等の各種化合物磁性体、あるいは鉄、コバルト等の金属磁性体等、種々の材料によるものがあり、検体に対して安定な物質を選択することができる。又、磁性微粒子に被検出物質に対して活性な第1の物質を結合させるのは、常法により物理結合又は化学結合によりなされる。

【0029】図6は本実施例の測定装置の構成図を示すもので、先の図1のものと同一の符号は同一の部材を表す。フローセル1を流れる反応液の中の複合体は、磁石20によって固体微粒子が磁化され、磁気センサである

磁束計 21 によって磁気測定が行われる。なお、予め磁化された担体粒子を使用するならば磁石 20 はなくても良い。

【0030】図 7 は上記磁化し得る物質を含む担体粒子（磁性微粒子）を用いた本実施例の測定の説明図であり、フローセル中の流通部内の様子を示す。シース液 34 に包まれるようにして流れるサンプル液中には、複合体 31、32、蛍光標識された第 2 の物質 33a、被検出物質 33b、担体粒子 33c、その他ゴミや気泡等が混在しており、これらが流通部内を順次流れる。照射レーザ光によって、担体粒子からは従来例のように散乱光が発生し、蛍光物質からは蛍光光が発生する。なお蛍光物質や被検出物質は非常に微小であるためこれらからは散乱光は発生しない、あるいは発生するにしても非常に微弱である。担体粒子と被検出物質と蛍光物質との複合体 31、32 が照射位置を通過すると、散乱光及び蛍光光の両方が発生する。本実施例の装置では固体微粒子が磁化し得る物質を含むため、磁石 20 と磁気センサ 21 を用いることにより、固体微粒子の磁気強度測定を行うことで、この磁気強度のピーク 73 が固体微粒子を示すことになる。よってこれをトリガにして蛍光光を検出する。又、散乱光と磁気強度の出力の論理積をとって担体粒子を認識しても良い。

【0031】図 8 は図 6 に示す装置における測定信号の波形図である。従来は蛍光光を検出するためのトリガ信号を生成するのに前方散乱光強度を用いていたが、図 8 の 72 のように担体粒子以外のゴミや気泡等によっても前方散乱光強度が大きくなるためここでトリガ信号が発生してしまい精度上問題があった。これに対して本実施例では通過する担体粒子の磁気強度を検出して、これが 30 ある閾値を越えたらトリガ信号 74 を生成する。あるいは磁気強度と散乱光の論理積によってトリガ信号を生成するようにしても良い。そしてこのトリガ信号のタイミングで蛍光光の強度 75 を測定する。よって本実施例では従来のようにゴミや気泡等のノイズ成分の影響を受けることなく、複合体中の標識物質量を精度良く測定して検体中の被検出成分の定量を高精度に行なうことができる。

【0032】次に上記実施例の作用効果を明確にするために次の実験を行なった。粒径 1.0  $\mu\text{m}$ 、粒子濃度 40 0.5 wt% のマグネタイトを粒子中に混合した磁性ポリスチレン微粒子の分散液を 10000 倍に希釈して、上記測定装置で測定を行なった。測定は従来例の方 50 法と本実施例の方法とを比較するため、まず前方散乱光の強度をトリガにしてそのトリガ数を 30 秒カウントした。次に磁気センサ 21 で得られる磁気強度をトリガにして同様に 30 秒間トリガ数をカウントした。その結果、前方散乱光をトリガにした従来の方法の方が約 20 %ほどカウント数が多かった。この結果でカウント数が高いのは、分散液に含まれるゴミや気泡等のノイズ成

分が影響してこれらがカウント値に含まれてしまったものと考えられる。このように磁性標識した微粒子を用いることにより S/N 比の高い高精度検出が可能となつた。

【0033】（変形例）本発明は上記実施例の形態に限らず種々の変形が可能である。例えば担体粒子の標識に放射性物質を使用し、放射線強度を検出してこれにより担体粒子を識別することができる。この場合、放射線の検出器は図 7 の磁気センサ 21 と同様に配置すれば良い。

【0034】又、以上の各実施例においては蛍光物質で第 2 の物質を標識したが、例えば高調波発生物質、磁性物質、放射性物質等で第 2 の物質を標識し、担体粒子自身の標識をこの第 2 の物質の標識情報とは異ならせて区別するようにしても本発明の作用効果は得られる。

### 【0035】

【発明の効果】以上説明したように、担体粒子に特有の標識をしてその標識を検出することで従来の測定法に比べてより高精度の測定が行えるという効果がある。

### 【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の第 1 の実施例の測定装置の構成図である。

【図 2】第 1 の実施例の測定を説明するための図である。

【図 3】第 1 の実施例の測定で得られる検出信号の波形図である。

【図 4】第 2 の実施例の測定を説明するための図である。

【図 5】第 2 の実施例の測定で得られる検出信号の波形図である。

【図 6】第 3 の実施例の測定装置の構成図である。

【図 7】第 3 の実施例の測定を説明するための図である。

【図 8】第 3 の実施例の測定で得られる検出信号の波形図である。

【図 9】従来のサンドイッチ法の説明図である。

【図 10】フローサイトメトリ技術を利用して蛍光測定を行なう従来例の説明図である。

【図 11】従来例における理想的な測定波形図である。

【図 12】従来例における実際の測定波形図である。

### 【符号の説明】

1 フローセル

2 レーザ光源

5 光検出器

7a, 7b ダイクロイックミラー

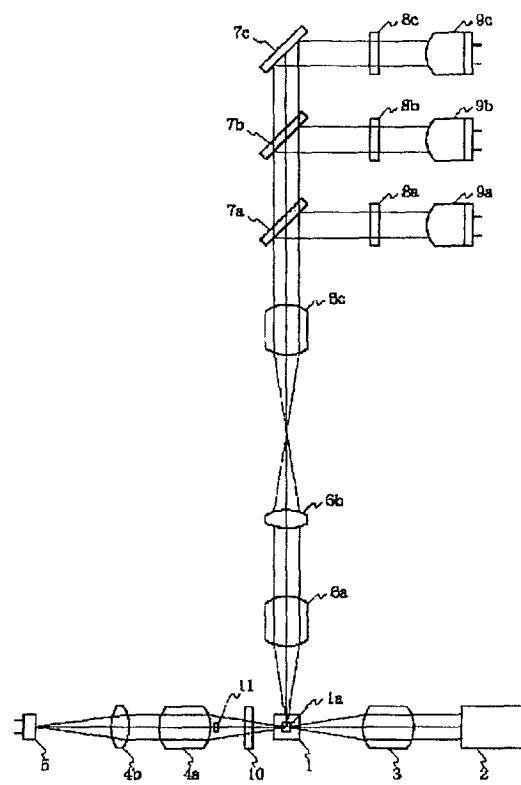
8a, 8b, 8c バリアフィルタ

9a, 9b, 9c 光検出器

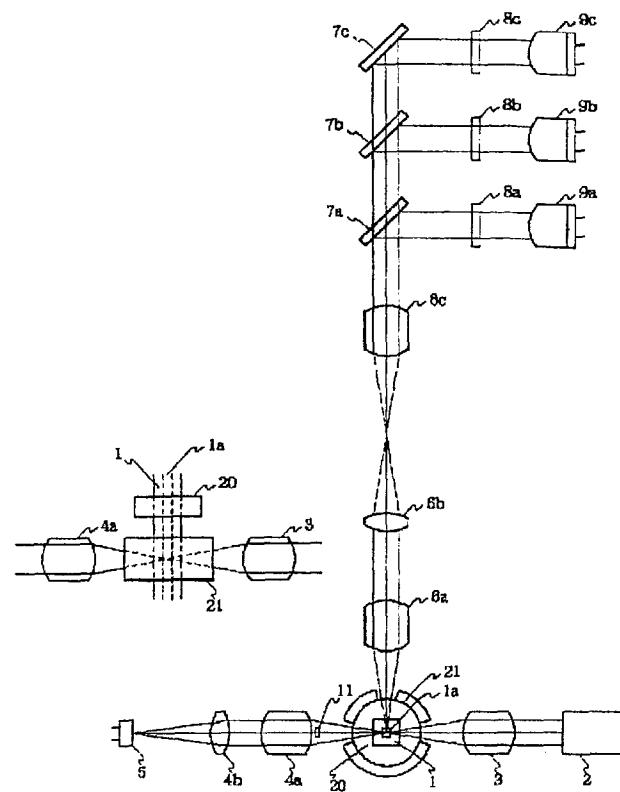
20 磁石

21 磁気センサ

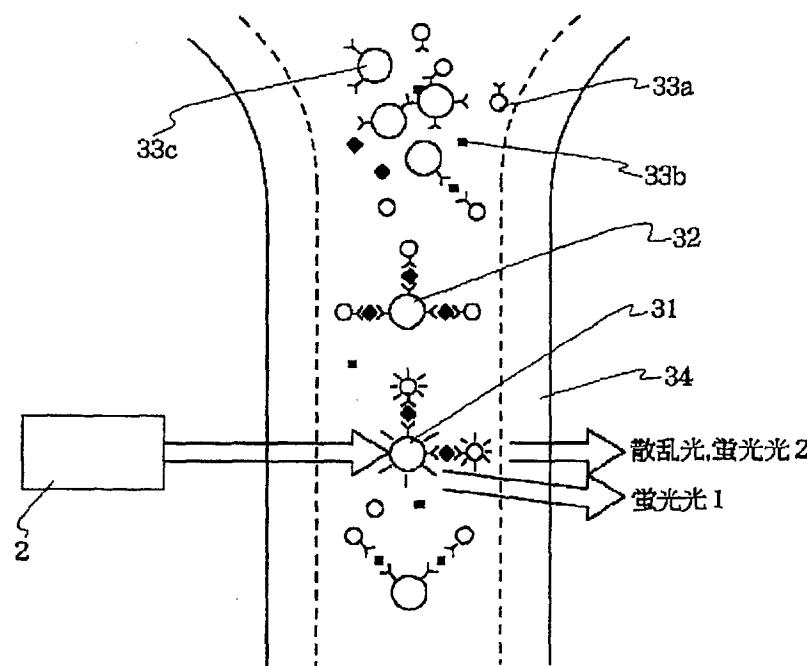
【図1】



【図6】

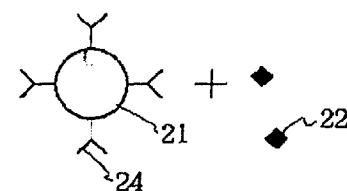


【図2】

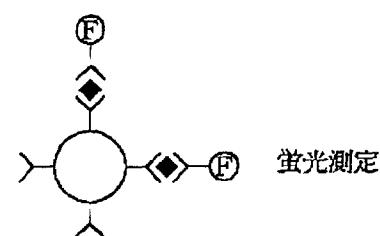
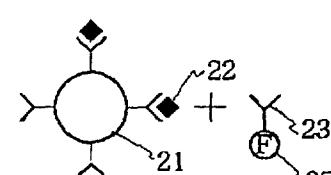


【図9】

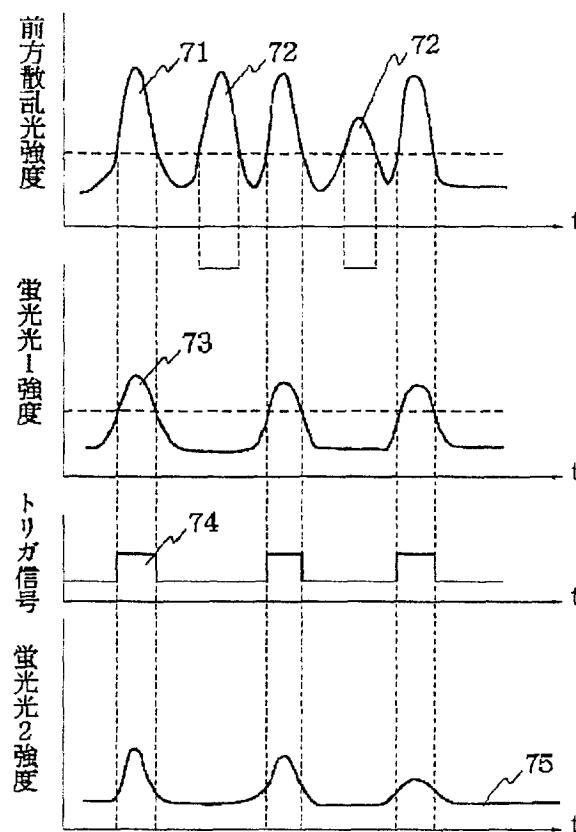
第1反応（検体との抗原抗体反応）



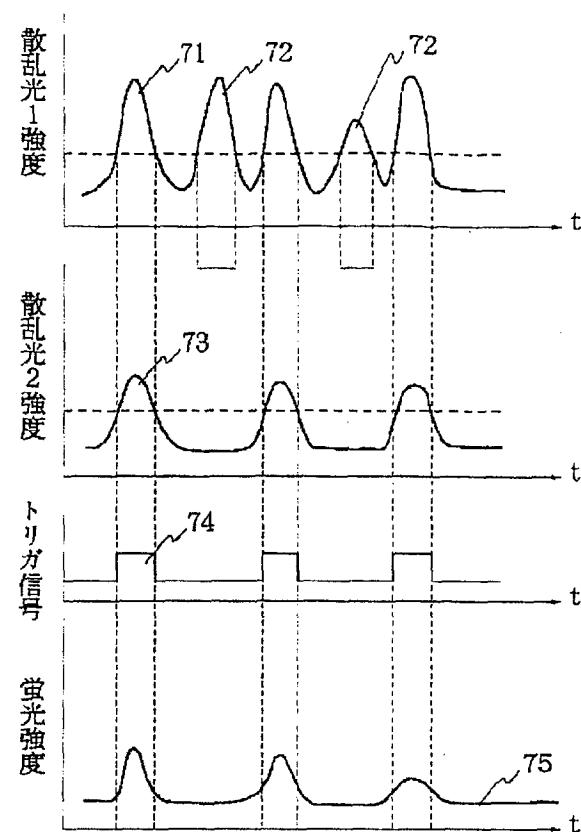
第2反応（標識化抗体との反応）



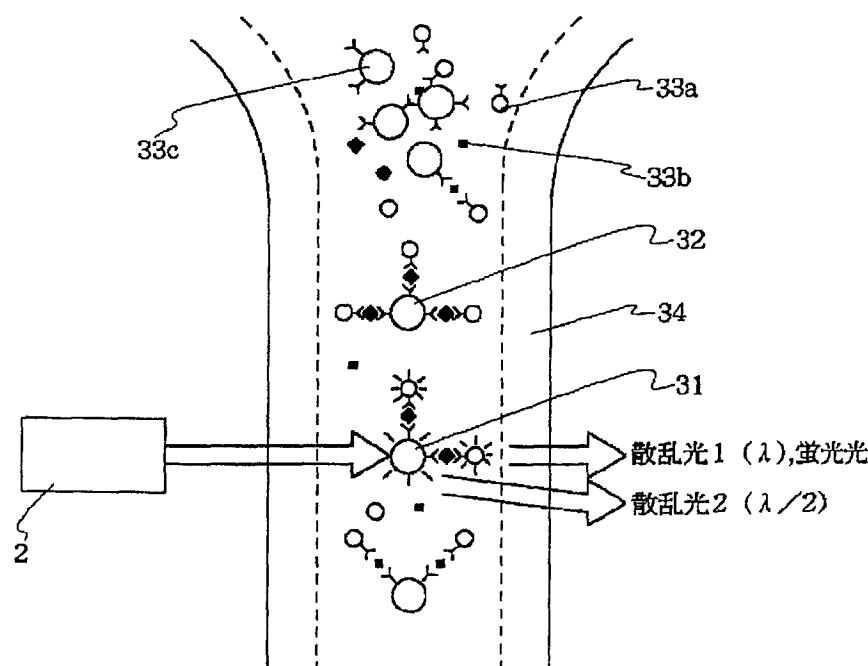
【図3】



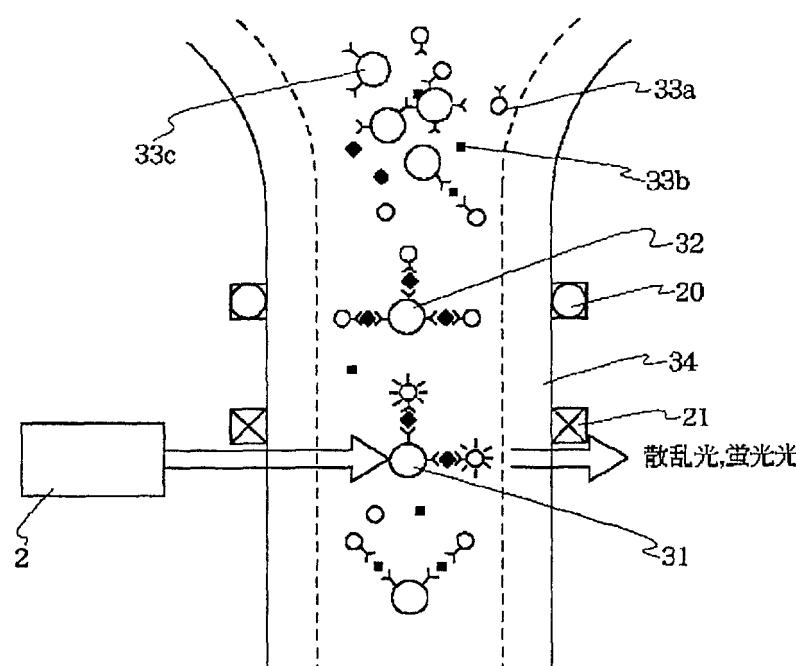
【図5】



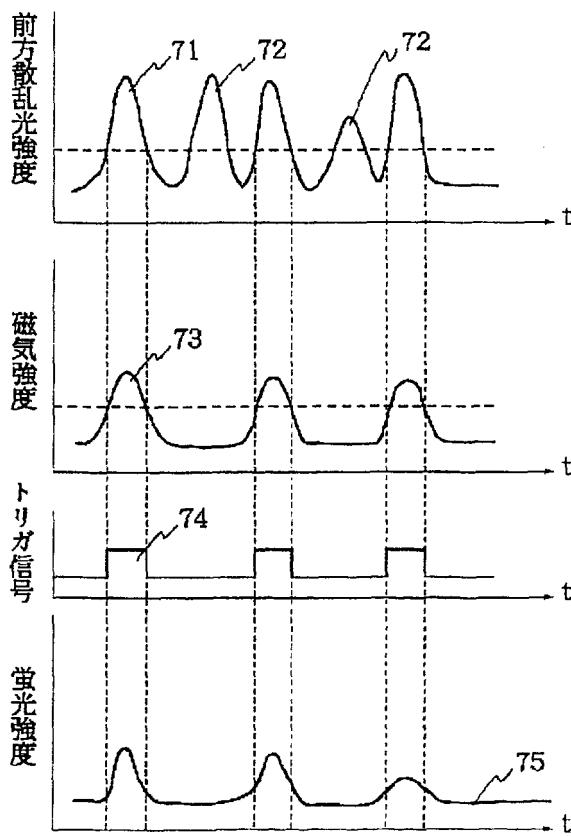
【図4】



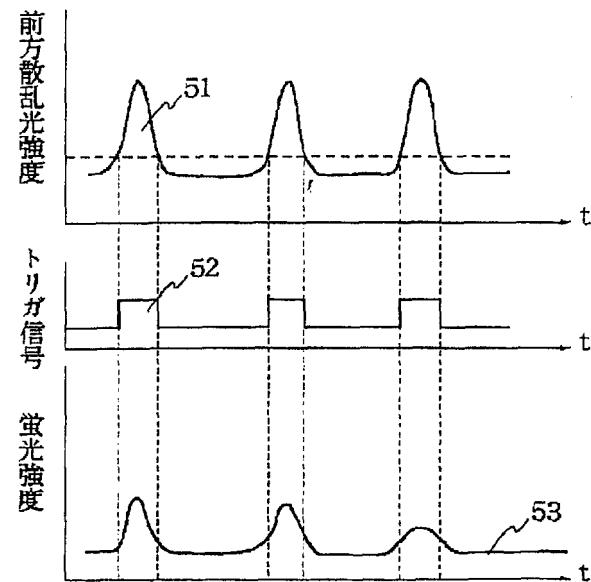
【図7】



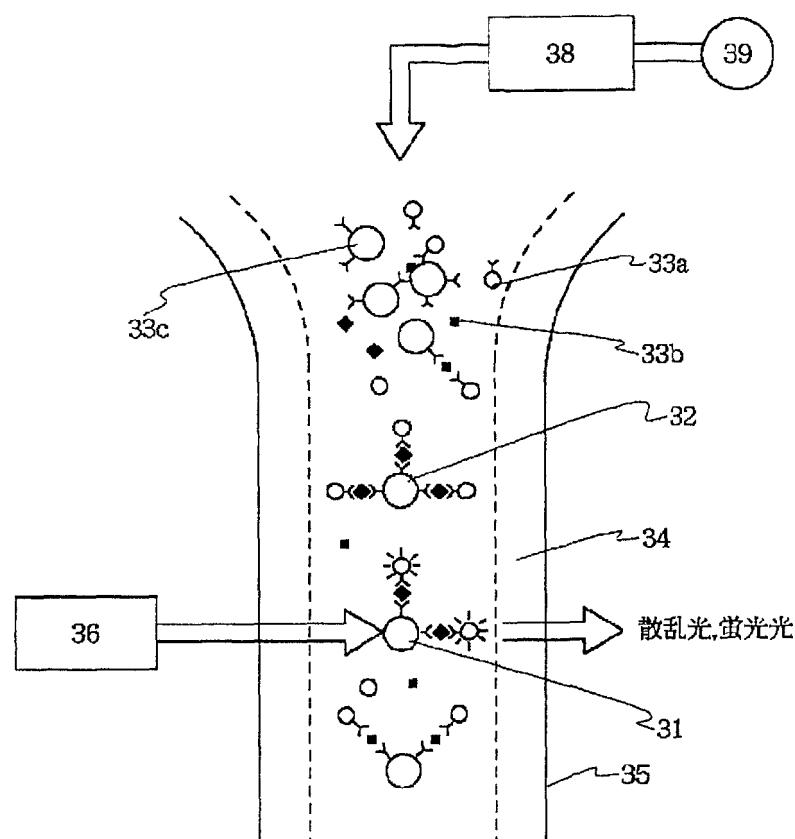
【図8】



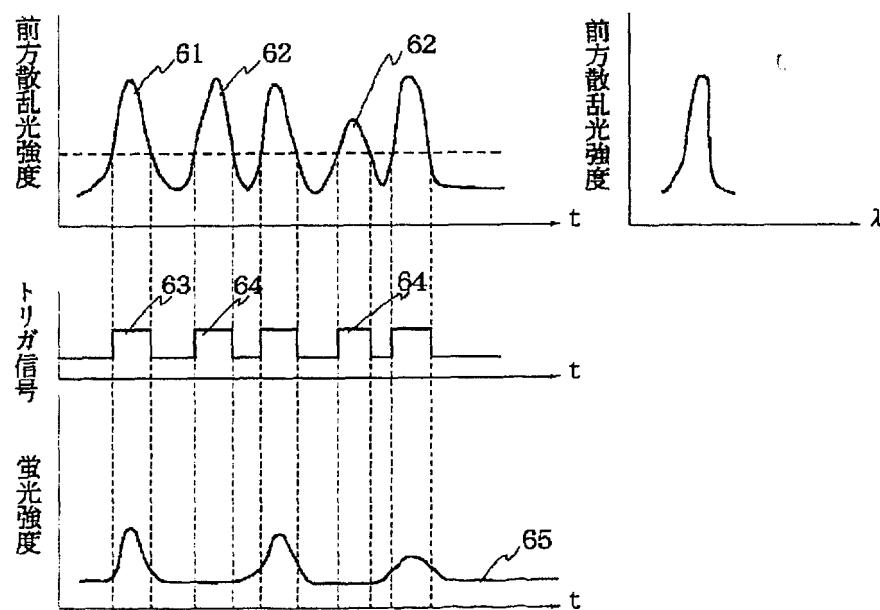
【図11】



【図10】



【図12】



フロントページの続き

(72) 発明者 西村 松臣  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノ  
ン株式会社内

(72) 発明者 宮崎 健  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノ  
ン株式会社内